

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

1/9/4

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

.- (c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010198362 **Image available**

WPI Acc No: 1995-099616/199514

XRAM Acc No: C95-045281

XRFX Acc No: N95-078717

Extraction of nucleic acid - using carrier for complexing the acid and reagent for precipitating the complexed acid/carrier

Patent Assignee: TOSOH CORP (TOYJ)

Inventor: YAMAGISHI H

Number of Countries: 002 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 4333805	A1	19950302	DE 4333805	A	19931004	199514 B
JP 7059572	A	19950307	JP 93230870	A	19930824	199518

Priority Applications (No Type Date): JP 93230870 A 19930824

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 4333805	A1	24	C12Q-001/68		
JP 7059572	A	16	C12N-015/09		

Abstract (Basic): DE 4333805 A

Nucleic acid (NA) is extracted by: (i) mixing a sample with a carrier of at least one of dextran, acrylamide or carboxymethyl cellulose resulting in a fluid; (ii) mixing (i) with C to ppte. the NAs and carriers, C consisting at least of (A) being guanidinium thiocyanate, guanidinium hydrochloride, potassium thiocyanate, sodium thiocyanate and of at least one of (B) being n-propyl alcohol, iso-propyl alcohol, n-butyl alcohol, sec.-butyl alcohol, tert. butyl alcohol and tert.-amyl alcohol; and (iii) sepn. of ppte.d NAs and carrier from the fluid phase. Also claimed is a kit of reagents including at least one carrier and separately reagent C.

USE - A specific NA is detected by the claimed methods including performing (i) to (iii), production from RNR of DNA by a reverse transcription reaction, followed by a PCR reaction whilst at the same time measuring the change in fluorescence intensity as a measure for the presence of a certain NA in the sample.

ADVANTAGE - In contrast to know methods of NA extn. and detection, the new method involves fewer steps, reduces the formation of aerosols, avoids the use of chloroform and phenol and is rapid.

Dwg.0/8

Title Terms: EXTRACT; NUCLEIC; ACID; CARRY; COMPLEX; ACID; REAGENT; PRECIPITATION; COMPLEX; ACID; CARRY

Derwent Class: A89; D16; E19; J04; S03

International Patent Class (Main): C12N-015/09; C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): C07H-021/00; G01N-027/447;

G01N-033/50; G01N-033/68

File Segment: CPI; EPI



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift
⑩ DE 43 33 805 A 1

⑥1 Int. Cl.⁸:
C 12 Q 1/68
C 07 H 21/00
G 01 N 33/68
// (C12Q 1/68, C12R
1:91) (C12Q 1/68,
C12R 1:19)

②1 Aktenzeichen: P 43 33 805.4
②2 Anmeldetag: 4. 10. 93
④3 Offenlegungstag: 2. 3. 95

DE 43 33 805 A 1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
24.08.93 JP 230870/93

⑦1 Anmelder:
Tosoh Corp., Shinnanyo, Yamaguchi, JP

⑦4 Vertreter:
Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann,
D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Hermann, G., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.;
Schmidt, J., Dipl.-Ing.; Jaenichen, H., Dipl.-Biol.
Dr.rer.nat., 81675 München; von
Uexküll-Güldenband-Menzel, A., Dr.phil. (Ph.D.),
82166 Gräfelfing; Weinberger, R., Dipl.-Chem.Univ.
Dr.rer.nat.; Bublak, W., Dipl.-Chem. Univ.,
Pat.-Anwälte, 81675 München

⑦2 Erfinder:
Yamagishi, Hiroaki, Kawasaki, Kanagawa, JP

⑤4 Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren und Verfahren zum Nachweis spezifizierter Nucleinsäuresequenzen

⑤7 Die Erfindung stellt ein verbessertes Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren aus einer Probe bereit, das die nachfolgenden Schritte umfaßt:
- Vermischen der Probe mit einem Träger, der mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose ist, um ein flüssiges Gemisch zu erzeugen;
- Vermischen des flüssigen Gemisches mit einem Reagenz C, um die Nucleinsäuren und den Träger zu fällen, wobei das Reagenz C mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol und tert.-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B enthält; und
- Separieren der ausgefällten Nucleinsäuren und des ausgefällten Trägers aus der flüssigen Phase.
Das Verfahren ist leichter anzuwenden als die bisher praktizierten Prozeduren, es beinhaltet eine geringere Anzahl von Schritten, kann die Möglichkeit einer Aerosolbildung vermindern, kann innerhalb einer kurzen Zeit durchgeführt werden, benötigt kein Phenol oder Chloroform und erreicht dennoch eine gleichbleibende Effizienz der Extraktion von Nucleinsäuren.
Ferner wird ein Verfahren zum Nachweisen einer bestimmten Nucleinsäuresequenz offenbart.

DE 43 33 805 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01.95 408 069/656

27/35

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren aus einer Probe. Genauer gesagt, betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren und ein Verfahren zum Nachweis einer spezifisierten Nucleinsäuresequenz, das sich in Biotechnologie und klinischer Diagnose verwenden läßt.

Das Extrahieren von Nucleinsäuren aus einer Probe stellt ein wichtiges Verfahren in der Biotechnologie, in der klinischen Diagnose und in anderen Gebieten dar. In Gen-Rekombinations-Verfahren ist z. B. sowohl das Isolieren der zu klonierenden DNA als auch von Vektor-DNA erforderlich, und zur Durchführung eines Gen-Tests auf genetische Krankheiten und Krebs-Gene ist es notwendig, Nucleinsäuren z. B. aus den im Blut vorhandenen Leukozytenzellen zu extrahieren.

Nucleinsäuren kommen im allgemeinen nicht als freie Moleküle vor, sondern in Bakterien, Zellen, Viruspartikeln usw., wo sie mit Zellmembranen und -wänden bedeckt sind, die sich aus Proteinen, Lipiden und Polysacchariden zusammensetzen. Nucleinsäuren selbst bilden Komplexe mit Histonen und anderen Proteinen. Zur Extraktion von Nucleinsäuren, die in dieser Weise vorliegen, müssen die sie bedeckenden Zellmembranen und -wände aufgebrochen werden, und die Proteine des erwähnten Komplexes müssen denaturiert oder abgebaut werden, um sie so zu solubilisieren. Dadurch werden die Nucleinsäuren freigesetzt und können dann extrahiert werden.

Herkömmlicherweise werden Nucleinsäuren nach einem der nachfolgenden Verfahren extrahiert:

(i) Das sogenannte Proteinase K-/Phenol-Verfahren, bei dem ein proteolytisches Enzym wie Proteinase K oder ein grenzflächen-aktiver Stoff zugegeben wird, wodurch die Zellmembran oder -wand aufgebrochen und das Protein des betreffenden Komplexes abgebaut wird, und Nucleinsäuren freigesetzt werden. Dann wird Phenol/Chloroform zugegeben, und das Gemisch wird zentrifugiert, wodurch die Nucleinsäuren in die wäßrige Phase überführt werden. Die wäßrige Phase wird dann abgetrennt und weiter verwendet. Ethanol, iso-Propylalkohol oder etwas ähnliches wird zur wäßrigen Phase gegeben, wodurch die Nucleinsäuren ausgefällt werden (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Appendices E3—E4, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989);

(ii) Das sogenannte AGPC-Verfahren, bei dem ein flüssiges Gemisch von Guanidiniumisothiocyanat und Phenol zur betreffenden Probe gegeben wird, um Zellmembran und -wand aufzubrechen und das Protein des Komplexes zu denaturieren und zu solubilisieren. Die Nucleinsäuren werden dann freigesetzt, und Chloroform wird zugegeben, um die Nucleinsäuren in die wäßrige Phase zu überführen. Die wäßrige Phase wird abgetrennt und weiter verwendet. Danach wird Ethanol, iso-Propanol oder etwas ähnliches zur wäßrigen Phase gegeben, wodurch die Nucleinsäuren ausgefällt werden (Acid Guanidinium-Thiocyanate Phenol-Chloroform Method: Analytical Biochemistry 162 (1987), S. 156—159);

(iii) Das sogenannte Guanidiniumverfahren, bei dem Guanidiniumhydrochlorid oder Guanidiniumthiocyanat zur betreffenden Probe gegeben wird, um Zellmembran und -Zellwand aufzubrechen und das Protein des Komplexes zu denaturieren und zu solubilisieren. Die Nucleinsäuren werden dann freigesetzt, und z. B. Ethanol wird zur Fällung der freien Nucleinsäuren zugegeben (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 7.23—7.25, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; und Analytical Biochemistry 162 (1987) S. 463; und

(iv) Das sogenannte Natriumjodid-Verfahren. Hier wird Glycogen enthaltendes Natriumjodid (Glycogen besitzt eine Affinität für die zu extrahierende Nucleinsäure) zur betreffenden Probe gegeben, um Zellmembran und -wand aufzubrechen und das Protein des Komplexes zu denaturieren und zu solubilisieren. Die Nucleinsäuren werden dann freigesetzt, und iso-Propanol wird zur Fällung von freien Nucleinsäuren und Glycogen zugegeben (Nucleic Acid Res. 19 (20) (1991), S. 592).

Sämtliche vier vorstehend beschriebenen Verfahren weisen spezifische Nachteile auf. Das Proteinase K-/Phenol-Verfahren schließt komplizierte Prozeduren ein, da der Abbau durch proteolytische Enzyme lange dauert und da eine Kontrolle der Temperatur für eine wirksame enzymatische Reaktion notwendig ist. Außerdem sind Phenol und Chloroform toxische Chemikalien (beide fallen unter die gesetzlich als giftig und gefährlich eingestuft Substanzen), und bei ihrer Handhabung ist das Tragen von Schutzkleidung und -handschuhen und die Verwendung chemischer Abzüge usw. notwendig. Ferner muß der aus der Extraktionsprozedur stammende flüssige Abfall speziell entsorgt werden, wodurch mehr Zeit und zusätzliche Gerätschaften benötigt und Extrakosten verursacht werden. Außerdem bedarf es einer großen Geschicklichkeit, die wäßrige Phase, in die die betreffenden Nucleinsäuren überführt wurden, abzutrennen. Dies macht es schwierig, eine gleichbleibende Effizienz bei der Extraktion von Nucleinsäuren zu erreichen.

Ähnliche Probleme gibt es im AGPC-Verfahren bezüglich der Handhabung von Phenol und Chloroform und ebenfalls bezüglich der Extraktionseffizienz. Diese ist abhängig vom Abtrennen und von der Rückgewinnung der wäßrigen Phase, in die die entsprechende Nucleinsäure überführt wurde. Außerdem ist das AGPC-Verfahren speziell für die Extraktion von RNA entwickelt und zur Extraktion von DNA ungeeignet.

Im Guanidiniumverfahren wird z. B. Ethanol nach der Zugabe von z. B. Guanidiniumhydrochlorid zur betreffenden Probe gegeben. Um einen nachfolgenden Abfall der Konzentration von Guanidinium in der Lösung zu verhindern, muß hochkonzentriertes (ca. 6 bis 8 M) Guanidinium verwendet werden. Damit ist aber eine erhöhte Möglichkeit des Auskristallisierens von Guanidiniumsalz gegeben (besonders im Winter, oder wenn die Raumtemperatur unter 20°C liegt). Das Auskristallisieren von Guanidiniumsalz kann zum Verstopfen von Pipetten oder anderen Ausrüstungsteilen führen, die zur Zugabe von z. B. Guanidiniumhydrochlorid verwendet werden, und dies stellt ein beträchtliches Hindernis für jeden Versuch dar, die Prozedur des Guanidiniumverfahrens zu mechanisieren. Ethanol oder etwas ähnliches wird nach dem Guanidiniumhydrochlorid oder ähnlichem zugegeben. Die Endkonzentration von z. B. Ethanol muß 50 bis 70% betragen, um die Nucleinsäuren unlöslich zu

machen. Das Probenvolumen ist jedoch wegen der Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid oder ähnlichem vergrößert, und deshalb muß man hochreinen Ethanol (ca. 100%) in einer Menge verwenden, die mindestens ebenso groß ist, wie die des flüssigen Gemisches von Probe und Guanidiniumhydrochlorid.

Das Natriumjodidverfahren ist mit dem Problem behaftet, daß es einer Inkubation bei 60°C bedarf, um Proteine oder ähnliches zu solubilisieren, was zu einer niedrigen Effizienz bei der RNA-Extraktion führt. Ein weiteres Problem besteht darin, daß labile Jodidionen (J^-) dazu neigen, durch die Wirkung von z. B. Licht oxidiert zu werden und ein Jodmolekül (J_2) zu erzeugen. Um dies zu vermeiden, müssen die Reagenzien in einem kalten dunklen Raum gelagert werden.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Kapitel 14, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) ist als ein Verfahren zur DNA-Amplifikation bekannt mit dem man zum Gen-Test (zur genetischen Diagnose) mit ultrahoher Empfindlichkeit in der Lage ist. Wenn die DNA-Amplifikation erfolgreich ist, besitzt die PCR das Potential zur mindestens 100 millionenfachen Amplifikation. Im Hinblick auf die Möglichkeit zur Amplifikation von sogar nur einem einzigen DNA-Molekül wird das Testergebnis jedoch beim Vorhandensein einer DNA (exogenen DNA), die in der PCR-Nucleinsäureprobe oder im PCR-Reagenz nicht anwesend sein sollte, nachteilig beeinträchtigt.

Eine Ursache für das Vorhandensein exogener DNA ergibt sich in dem Stadium, in dem Nucleinsäuren aus der vorliegenden Probe zur Präparation der PCR-Nucleinsäureprobe extrahiert werden. Dies betrifft auch das während der Nucleinsäureextraktion erzeugte Aerosol. Beim Proteinase K-/Phenol- oder beim AGPC-Verfahren wird sehr wahrscheinlich ein Aerosol erzeugt. Diese Verfahren beinhalten nämlich abgesehen von der Reagenzienzugabe zur Probe und von der Ausführung anderer Prozeduren wie dem Vermischen von Medien, außerdem zeitaufwendige Prozeduren, wie die Gewinnung der wäßrigen Phase durch Abtrennen. Die Aerosolpartikel haben einen Durchmesser von ungefähr 20 µm und ihr Volumen beträgt nur ungefähr 4×10^{-6} µl. Wenn man z. B. einen an Hepatitis B leidenden Patienten betrachtet, ergibt sich folgende Überlegung: In 1 µl Blut können ungefähr 10^5 Viruspartikel enthalten sein. Somit kann ein Aerosolpartikel ein Viruspartikel enthalten. Mit anderen Worten, das Aerosol kann in der PCR, die zur Amplifikation eines einzigen DNA-Moleküls in der Lage ist, ernsthaften Schaden stiften. Deshalb gibt es einen Bedarf, die Anzahl der involvierten Verfahrensschritte zu vermindern.

Zur Verminderung der Aerosolbildung in einem PCR-Verfahren wurde in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 487 218 vorgeschlagen, die PCR in einem hermetisch abgeschlossenen Zustand, unter Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (eines Fluorochroms) zur Quantifizierung einer Ziel-DNA in einer Probe durchzuführen. Das Problem, die Aerosolbildung bei der Extraktion der Nucleinsäure aus der Probe zu reduzieren, bleibt jedoch bestehen.

Eine Aufgabe der Erfindung besteht darin, die vorstehend genannten Probleme der herkömmlichen Verfahren zur Nucleinsäure-Extraktion zu beseitigen oder zu verringern.

Genauer gesagt besteht diese Aufgabe in der Bereitstellung eines neuen Verfahrens zur Extraktion von DNA und RNA, das leicht durchzuführen ist, eine geringere Anzahl von Schritten einschließt, fähig ist, die Möglichkeit einer Aerosolbildung zu verringern, innerhalb kurzer Zeit ausführbar ist, kein Phenol oder Chloroform verwendet und dennoch eine gleichbleibende Wirksamkeit bei der Extraktion von Nucleinsäuren erreicht.

Diese Aufgabe wird durch die erfindungsgemäße Bereitstellung eines Verfahrens zur Extraktion von Nucleinsäuren aus einer Probe gelöst, das die nachfolgenden Schritte umfaßt:

- (1) Vermischen der Probe mit einem Träger zur Erzeugung eines flüssigen Gemisches, wobei der Träger mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose ist;
- (2) Vermischen des flüssigen Gemisches mit dem Reagenz C, um Nucleinsäuren und Träger auszufällen, wobei das Reagenz C mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein unter den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek-Butylalkohol, tert-Butylalkohol und tert-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B enthält; und
- (3) Separieren von ausgefällten Nucleinsäuren und Träger aus der flüssigen Phase.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zum Nachweis einer spezifizierten Nucleinsäuresequenz, das die Gefahr einer Aerosol-Kontamination vermeidet oder vermindert.

Diese Aufgabe wird durch die erfindungsgemäße Bereitstellung eines Nachweisverfahrens gelöst, das die nachfolgenden Schritte umfaßt:

- (1) Vermischen der Probe mit einem Träger zur Erzeugung eines flüssigen Gemisches, wobei der Träger mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose ist;
- (2) Vermischen des flüssigen Gemisches mit dem Reagenz C, um Nucleinsäuren und Träger auszufällen, wobei das Reagenz C mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek-Butylalkohol, tert-Butylalkohol und tert-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B enthält;
- (3) Separieren von ausgefällten Nucleinsäuren und Träger aus der flüssigen Phase;
- (4) Überführen der separierten Nucleinsäuren in DNA mittels einer reversen Transkriptionsreaktion, wenn es sich bei den separierten Nucleinsäuren um RNA handelt;
- (5) Unterwerfen der entweder in Schritt (3) separierten oder in Schritt (4) erhaltenen Nucleinsäuren einer Polymerase-Kettenreaktion in einer PCR-Lösung, die ein Gemisch der Nucleosidtriphosphate, eine Polymerase, ein interkalierendes Fluorochrom und eine Oligonucleotid-Sonde enthält, die als Primer zur Ampli-

fikation mindestens einer bestimmten Sequenz geeignet ist;

(6) Messen der Änderung der Fluoreszenzintensität als Folge der PCR bzw. der sich während der PCR ergebenden Änderung der Fluoreszenzintensität der Reaktionslösung; und

(7) Bestimmen (auf der Basis der Änderung der Fluoreszenzintensität), ob eine Nucleinsäure mit der spezifizierten Sequenz in der Probe vorhanden war.

Ferner stellt die vorliegende Erfindung eine Packung von Reagenzien zur Extraktion von Nucleinsäuren bereit, die voneinander getrennt mindestens die folgenden Bestandteile enthält:

(1) Einen mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose enthaltenden Träger; und

(2) ein Reagenz C, das mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol und tert.-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B enthält.

Fig. 1 stellt eine Photographie und ein diese verdeutlichendes Diagramm dar. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Elektrophorese, die nach der PCR-Amplifikation von DNA des Hepatitis B-Virus (HBV) vorgenommen wurde, wobei die Nucleinsäure des Virus nach dem erfindungsgemäßen Verfahren extrahiert worden war; Spuren 1 und 2: HBV-reiches Serum, Spuren 3 und 4: HBV-armes Serum, Spur 5: HBV-freies Serum; die Bande a zeigt das PCR-Amplifikationsprodukt und die Bande b das Primer-Oligomer;

Fig. 2 stellt eine Photographie und ein diese verdeutlichendes Diagramm dar. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Elektrophorese, die nach PCR-Amplifikation von DNA des Hepatitis C-Virus (HCV) vorgenommen wurde, wobei die Nucleinsäure des Virus nach dem erfindungsgemäßen Verfahren extrahiert worden war; Spuren 1 und 2: HCV-reiches Serum; Spuren 3 und 4: HCV-armes Serum; Spur 5: HCV-freies Serum;

Fig. 3 stellt eine Photographie und ein diese verdeutlichendes Diagramm dar. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Elektrophorese, die nach PCR-Amplifikation von DNA des Hepatitis B-Virus vorgenommen wurde, wobei die Nucleinsäure des Virus nach dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung der nachstehend aufgeführten unterschiedlichen Zusammensetzungen von Reagenz C extrahiert worden war; Spuren 1 und 2 (1): das Reagenz C enthält 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol; Spuren 3 und 4 (2): das Reagenz C enthält 2,4 M Kaliumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol; Spuren 5 und 6 (3): das Reagenz C enthält 2,3 M Guanidiniumhydrochlorid, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol;

Fig. 4 stellt eine Photographie und ein diese verdeutlichendes Diagramm dar. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Elektrophorese, die nach PCR-Amplifikation von DNA des Hepatitis B-Virus vorgenommen wurde, wobei die Nucleinsäure des Virus nach dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung des in Beispiel 7 beschriebenen Reagenz C extrahiert worden war, wobei die nachfolgend aufgeführten Zusammensetzungen von Reagenz B als Bestandteil von Reagenz C verwendet wurden: Spuren 1 und 2 (1): 60% n-Propylalkohol; Spuren 3 und 4 (2): 60% iso-Propylalkohol; Spuren 5 und 6 (3): 50% n-Butylalkohol; Spuren 7 und 8 (4): 60% n-Butylalkohol; Spuren 9 und 10 (5): 50% sek.-Butylalkohol; und Spuren 11 und 12 (6): 60% sek.-Butylalkohol;

Fig. 5 stellt eine Photographie und ein diese verdeutlichendes Diagramm dar. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Elektrophorese, die nach PCR-Amplifikation von RNA des Hepatitis B-Virus durchgeführt wurde, wobei die Nucleinsäure des Virus nach dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Verwendung des in Beispiel 8 beschriebenen Reagenz C extrahiert worden war, wobei die nachfolgend aufgeführten Typen von Reagenz B als Bestandteil von Reagenz C verwendet wurden: Spuren 1 und 2 (1): 50% tert.-Amylalkohol; Spuren 3 und 4 (2): 60% tert.-Amylalkohol; Spuren 5 und 6 (3): 60% tert.-Butylalkohol; Spuren 7 und 8 (4): 60% iso-Propylalkohol;

Fig. 6 stellt eine Photographie und ein diese verdeutlichendes Diagramm dar. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Elektrophorese, die nach PCR-Amplifikation von DNA des Hepatitis B-Virus vorgenommen wurde, wobei die Nucleinsäure des Virus nach dem erfindungsgemäßen Verfahren extrahiert worden war, wobei Dextran in den betreffenden Tests in folgenden Mengen verwendet wurde: Spuren 1 und 2: 0 µg; Spuren 3 und 4: 2 µg; Spuren 5 und 6: 4 µg; Spuren 7 und 8: 8 µg; Spuren 9 und 10: 16 µg; Spuren 11 und 12: 32 µg, Spuren 13 und 14: 64 µg;

Fig. 7 stellt eine Photographie und ein diese verdeutlichendes Diagramm dar. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Elektrophorese, die nach PCR-Amplifikation von DNA des Hepatitis B-Virus durchgeführt wurde, wobei die Nucleinsäure des Virus analog zu Beispiel 3 unter Verwendung von Dextran oder Carboxymethylcellulose als Träger extrahiert worden war; Spuren 1 und 2: Dextran; Spuren 3 und 4: Carboxymethylcellulose;

Fig. 8 stellt ein Paar von Diagrammen dar, in denen die Ergebnisse der Experimente von Beispiel 12 gezeigt sind. Eine Reaktionslösung einer PCR wurde vor (Fig. 8a) und nach (Fig. 8b) Nucleinsäureextraktion durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie untersucht. Die Elutionszeit ist (in Minuten) auf den horizontalen Achsen und die relative Absorption auf den vertikalen Achsen aufgetragen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren (einzeln- oder doppelsträngiger DNA und RNA) u Beispiele für DNA, die sich nach dem Verfahren extrahieren läßt, schließen nicht nur genomische DNA ein, sondern auch Mitochondrien- oder Chloroplasten-DNA, und Beispiele für RNA, die sich nach dem Verfahren extrahieren läßt, schließen nicht nur mRNA sondern auch tRNA und rRNA ein. Nucleinsäuren enthaltende Proben sind beispielsweise lebende Proben, wie Leukozytenzellen, gezüchtete Wirtszellen, die typischerweise durch Gen-Rekombinationstechnik hergestellte Vektoren usw. enthalten, Zellen, die mit Viren oder Phagen infiziert sind, Viren im Blut und Kulturen von Proben von Mikroorganismen. Die Kultur kann Mikroorganismen enthalten, aber der Kulturüberstand allein ist ausreichend. Nicht nur künstliche Kulturen

sondern auch natürlich vorkommende Kulturen sind verwendbar. Falls die Proben Klumpen von Mikroorganismen enthalten, kann man zum Erzielen einer hohen Extraktionseffizienz nötigenfalls homogenisieren oder mit Ultraschall behandeln.

Erfindungsgemäß können Nucleinsäuren aus den vorstehend beschriebenen Proben extrahiert werden. Eine weitere Anwendung der vorliegenden Erfindung liegt in der Extraktion amplifizierter Nucleinsäuren aus einer PCR-Lösung in hoher Ausbeute, so daß in den amplifizierten Nucleinsäuren keine Enzyme oder niedermolekulare Desoxyribonucleosid-Triphosphate, Primer usw. enthalten sind.

Der erste Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in einem Vermischen der die Nucleinsäure enthaltenden Probe mit einem Träger. Ein Vermischen mit dem Träger unterstützt die Bildung eines größeren unlöslichen Materials durch ein Vernetzen von Nucleinsäuren und Träger im nachfolgenden Ausfällen von Nucleinsäuren und Träger durch Zugabe von Reagenz C. Dadurch läßt sich das nachfolgende Abtrennen des unlöslichen Materials in einer vereinfachten Weise vornehmen. Somit trägt die Verwendung des Trägers zu einer höheren Extraktionseffizienz bei, als man ohne seine Verwendung erreichen würde.

Der Träger besitzt eine Affinität für die zu extrahierenden Nucleinsäuren und wird unlöslich, wenn er in Kontakt mit dem in Reagenz C enthaltenen Reagenz B gelangt. Da der Träger zusammen mit den Nucleinsäuren extrahiert wird, sollte er nicht die spezifische Verwendung der extrahierten Nucleinsäuren wie die Reaktion mit einem Restriktionsenzym, die reverse Transkriptionsreaktion oder die PCR beeinträchtigen. Der erfindungsgemäß zu verwendende Träger ist mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose. Diese Träger erweisen sich als zufriedenstellend wirksam, unabhängig davon, ob sie einzeln oder als Mischungen verwendet werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß sie weder die reverse Transkriptionsreaktion, die PCR oder irgend eine andere gewünschte Reaktion beeinträchtigen. Glycogen und andere herkömmliche Träger werden durch Amylase oder andere Enzyme, die in der Probe, wenn es sich bei dieser um Serum oder Blut handelt, vorhanden sind, abgebaut, mit dem Ergebnis, daß sich die Effizienz der Nucleinsäureextraktion vermindert. Im Gegensatz dazu wird der erfindungsgemäß verwendete Träger nicht abgebaut, und dementsprechend ergibt sich keine Verminderung der Effizienz der Nucleinsäureextraktion.

Im allgemeinen wird der Träger in Mengen von ungefähr 0,01 bis 1000 µg, bevorzugt ungefähr 0,1 bis 100 µg pro 10 µl Probenvolumen verwendet. Der Träger kann in einem Gefäß vorgelegt werden, bevor die Probe hineingegeben wird. Alternativ kann die Probe vor Zugabe des Trägers in das Gefäß gegeben werden. Der Träger kann durch Gefrier- oder Lufttrocknen in eine feste Substanz überführt werden.

Im nächsten Schritt wird zum flüssigen Gemisch von Probe und Träger das Reagenz C gegeben, und die Bestandteile werden vermischt, um Träger und Nucleinsäuren auszufällen. Das Reagenz C enthält mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propanol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol und tert.-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B.

Das Reagenz C kann außerdem andere Reagenzien enthalten. Zum Beispiel: ein zur Unterdrückung des Nucleinsäureabbaus geeignetes Puffer-Mittel; ein Chelatisierungsmittel, das zur Hemmung der Aktivität von Nucleasen (Desoxyribonucleasen) fähig ist, wie z. B. Natriumcitrat oder EDTA; ein Reduktionsmittel zum Erreichen einer wirksameren Denaturierung und Solubilisierung von Proteinen, Lipiden usw., wie z. B. Dithiothreitol oder β-Mercaptoethanol, die Disulfidbindungen reduzieren und eine grenzflächenaktive Substanz, wie z. B. ein Sarkosylsalz oder Triton, um eine wirksamere Solubilisierung von Proteinen usw. zu erreichen. Ein geeignetes Puffermittel kann zur Einstellung des pH-Wertes von Reagenz C auf den Bereich von 4 bis 9, bevorzugt von 5 bis 8 zugegeben werden, um so den Abbau von Nucleinsäuren zu verhindern, wodurch eine weitere Verbesserung der Effizienz ihrer Extraktion erreicht wird.

Im erfindungsgemäßen Extraktionsverfahren wird mindestens eine der Verbindungen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat oder Natriumthiocyanat als Reagenz A verwendet. Diese Verbindungen brechen die Zellmembran oder die Zellwand auf und denaturieren das Protein im Komplex. Sie sind außerdem fähig, das denaturierte Protein, das sich entweder als Ergebnis des Denaturierens des Proteins im Komplex oder wegen des begleitenden Reagenz B bildet, zu solubilisieren. Gleichzeitig sind die Verbindungen fähig, die Aktivität von Nucleasen (Desoxyribonucleasen und Ribonucleasen), die sich in der Probe befinden mögen, zu unterdrücken. Das erfindungsgemäß verwendete Reagenz A besitzt in hohem Maße die Fähigkeit sowohl allein als auch in Kombination zweier oder mehrerer Substanzen Proteine zu solubilisieren, ohne dabei irgendwelche störenden Reaktionen zu verursachen. Es macht daher eine hohe Effizienz der Nucleinsäure-Extraktion möglich. Allgemein bekannte proteindenaturierende Mittel wie Natriumjodid, Kaliumjodid, Kaliumbromid, Natriumbromid und Harnstoff sind nicht derartig wirksam, Proteine usw. zu solubilisieren; andererseits verursachen Guanidiniumsulfat, Guanidiniumcarbonat usw. Proteinaggregation usw. und sind daher nicht fähig, Nucleinsäuren mit hoher Effizienz zu extrahieren.

Erfindungsgemäß wird mindestens eine der Substanzen n-Propanol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol oder tert.-Amylalkohol als Reagenz B verwendet. Wenn man ein Gemisch von zwei oder mehr Alkoholen verwendet, kann man ein vorteilhaftes Verhältnis der Alkohole durch Vorexperimente bestimmen. Das erfindungsgemäße Reagenz B besitzt eine hohe Löslichkeit in Wasser und geht nicht ohne weiteres eine Phasentrennung mit Wasser ein. Die Verwendung von Reagenz B bietet daher den Vorteil, daß das Abtrennen von gefällten Nucleinsäuren und Träger aus der wäßrigen Phase in einfacher Weise ausführbar ist. Das bedeutet letzten Endes, daß sich die Ausbeute der gefällten Nucleinsäuren im letzten Schritt des Verfahrens erhöhen läßt.

Die Konzentration der Reagenzien A und B in Reagenz C kann man in solch einer Weise einstellen, daß bei Zugabe von Reagenz C zu der den Träger enthaltenden Probe Proteine, Lipide usw. gelöst bleiben, Nucleinsäuren und der Träger aber gefällt werden. Besonders bevorzugte Konzentrationen zur Verbesserung der Extraktionseffizienz sind solche, bei denen die Endkonzentration des Reagenz wie es zur Probe zugegeben wird, für

Reagenz A im Bereich von 1,5 bis 4,5 M und für Reagenz B im Bereich von ungefähr 40 bis 80% liegt.

In dem Fall, daß das Reagenz C z. B. Guanidiniumthiocyanat als Reagenz A und iso-Propylalkohol als Reagenz B enthält, liegen die Konzentrationen für eine besonders hohe Effizienz der Nucleinsäure-Extraktion so, daß die Endkonzentration von Reagenz A nach dem Mischen mit der Probe im Bereich von 2 bis 3 M liegt, wohingegen die Endkonzentration von Reagenz B nach dem Mischen mit der Probe im Bereich von 45 bis 55% liegt. Wenn die Endkonzentration von Guanidiniumthiocyanat geringer als 1,5 M ist, können die in der Probe enthaltenen Proteine, Lipide usw. nicht voll solubilisiert werden. Zur Erhöhung der Endkonzentration von Guanidiniumthiocyanat über 4,5 M muß der Anteil von Reagenz A im Reagenz C erhöht werden. Dann neigt aber das Reagenz A dazu, unlöslich zu werden, wodurch Schwierigkeiten bezüglich einer geeigneten Zubereitung einer Probe entstehen. Wenn die Endkonzentration von iso-Propylalkohol unter 40% liegt, können Träger und Nucleinsäuren nicht vollständig gefällt werden. Wenn die Endkonzentration von iso-Propylalkohol 80% überschreitet, ist es schwierig, eine Guanidiniumthiocyanat-Konzentration sicherzustellen, die ausreicht, Proteine, Lipide usw. vollständig zu solubilisieren. Ferner wird die Verdampfung von iso-Propylalkohol problematisch. Deshalb werden die Reagenzien erfindungsgemäß bevorzugt in den vorstehend angegebenen Konzentrationsbereichen verwendet.

Eine geeignete Menge zur Zugabe von Reagenz C liegt beim 2- bis 10fachen des Probenvolumens, wenn es sich bei der Probe um Serum handelt. Wenn die Probe jedoch hohe Konzentrationen von Proteinen, Lipiden usw. aufweist, wird das Reagenz C bevorzugt in einer größeren Menge als dem 10fachen Probenvolumen zugegeben, um eine vollständige Solubilisierung von Proteinen, Lipiden usw. zu gewährleisten.

Durch die vorstehend beschriebenen Schritte werden Träger und Nucleinsäuren in der Probe gefällt. Anschließend werden die so gefällten Nucleinsäuren und der Träger durch herkömmliche Abtrennungsv Verfahren wie Zentrifugation oder Filtration von der wäßrigen Phase abgetrennt, die die Proteine usw. enthält. Im Falle einer Zentrifugation können die Nucleinsäuren als Sediment am Boden des Gefäßes gewonnen werden. Im Falle einer Filtration können die Nucleinsäuren auf der Filtermembran erhalten werden. Bei der Filtermembran kann es sich um einen Typ handeln, der Poren mit einer Größe von ungefähr 0,1 bis 10 µm besitzt.

Die separierten Nucleinsäuren kann man als solche in einer Reihe von Tests und in gentechnologischen Experimenten einsetzen. Bevorzugt werden sie aber vor der Verwendung gewaschen. Ein Vor-Waschen ist besonders wirksam, wenn man die separierten Nucleinsäuren einer Enzymreaktion (z. B. einer Restriktionsenzym-Reaktion, einer reversen Transkriptionsreaktion oder einer PCR) unterwirft, und in allen anderen Fällen, in denen das Reagenz A oder etwas ähnliches, das in geringem Maße im Präzipitat enthalten ist, die Enzymaktivität, inhibiert. Hier sei ein spezifisches Beispiel gegeben: zu dem durch Zentrifugation oder Filtration erhaltenen Präzipitat wird eine ein Salz und einen Alkohol enthaltende Lösung gegeben und mit dem Präzipitat vermischt. Das Gemisch wird dann einer weiteren Zentrifugation oder Filtration unterworfen. Verglichen mit einem bloßen Waschen des Präzipitates mit destilliertem Wasser oder ähnlichem, weist das Waschen mit einer Salz/Alkohol enthaltenden Lösung den Vorteil auf, daß es dazu beiträgt, von der Oberfläche des Sedimentes unerwünschte Substanzen, wie das Reagenz A oder restliche Proteine wirksam zu entfernen. Als Salz in der Waschlösung können z. B. Kaliumchlorid, Natriumchlorid und Natriumacetat in Mengen von ungefähr 0,05 bis 0,5 M verwendet werden. Beispiele für Alkohole schließen Ethanol (der in Mengen von mindestens 50%, bevorzugt von 60 bis 80% enthalten sein kann) ebenso ein, wie n-Propylalkohol und iso-Propylalkohol (die in einer Menge von mindestens 30%, bevorzugt von 40 bis 60% enthalten sein können).

Falls es speziell notwendig sein sollte, jedes restliche Protein aus dem Präzipitat zu entfernen, kann man die nachfolgende Prozedur anwenden: Zuerst wird zum Präzipitat wieder eine Lösung gegeben, die das Reagenz A, wie es vorstehend spezifiziert wurde, enthält, um so die Proteine zu solubilisieren. Dann wird eine Lösung zugegeben, die das Reagenz B, wie es vorstehend spezifiziert wurde, enthält, und das Gemisch wird einer Zentrifugation oder Filtration unterworfen. Selbstverständlich können die Schritte 2 und 3 des erfindungsgemäßen Verfahrens einfach wiederholt werden. Wenn sehr kleine Nucleinsäuremengen extrahiert werden, wird beim erfindungsgemäßen Verfahren die Probe auf geeignete Weise bei einer niedrigen Temperatur gehalten, z. B. dadurch, daß die Gesamtprozedur in einem Kühlraum vorgenommen wird.

Gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung werden die so extrahierten Nucleinsäuren daraufhin untersucht, ob sie eine bestimmte Sequenz, z. B. solch eine, wie sie in Hepatitis B-Virus oder Hepatitis C-Virus vorkommt, enthalten, die sie von anderen Nucleinsäuren unterscheidbar macht und die Erfindung stellt ein Nachweisverfahren bereit, bei dem die im allgemeinen als PCR-Reaktion bezeichnete Technik der DNA-Amplifikation Anwendung findet; siehe diesbezüglich: Europäischen Patentanmeldung Nr. 487 218.

Wenn es sich bei den in vorstehender Weise separierten und vorzugsweise gewaschenen Nucleinsäuren um RNA handelt, wird diese zunächst erfindungsgemäß durch eine reverse Transkriptionsreaktion in DNA überführt. Dies ist z. B. beim Hepatitis C-Virus, dessen Genom aus RNA besteht, der Fall. Erfindungsgemäß wird RNA vor dem nachstehend beschriebenen Amplifikationsschritt in amplifizierbare DNA überführt, um so die PCR zur DNA-Amplifikation verwenden zu können. Dieser Schritt läßt sich durch DNA-Synthese mittels der gewöhnlichen reversen Transkriptionsreaktion erreichen, wobei die separierte RNA als Matrize verwendet wird.

Im nächsten Schritt werden die separierten Nucleinsäuren oder die Nucleinsäuren, die durch eine reverse Transkriptionsreaktion im früheren Schritt erhalten worden waren, einer PCR in einer PCR-Lösung unterworfen, die ein Gemisch von Nucleosidtriphosphaten, eine Polymerase, ein interkalierendes Fluorochrom und eine Oligonucleotid-Sonde enthält, die mindestens zur Amplifikation der spezifizierten Sequenz geeignet ist. Die Oligonucleotid-Sonde in der PCR-Lösung besteht aus zwei oder mehr Oligonucleotiden, die eine geeignete Zahl von Basen aufweisen. Sie sind zur Herstellung von DNA-Fragmenten, die die spezifizierte Sequenz enthalten, wenn die PCR fortschreitet, notwendig und sie liegen in den schließlich hergestellten DNA-Fragmenten an den 5'-Enden. Eine geeignete oligonucleotid-Sonde läßt sich entsprechend der spezifizierten nachzuweisenden Se-

quenz auswählen.

Beispiele für das erfindungsgemäß verwendete interkalierende Fluorochrom sind Ethidiumbromid, Acridinorange, Bisbentimid, Diaminophenylindol, Actinomycin, Thiazol, Chromomycin und Derivate dieser Substanzen. In der PCR selbst besteht ein Zyklus aus den nachfolgenden Verfahrensschritten: Die 3'-terminalen Anteile der spezifizierten und der dazu komplementären Sequenz werden mit den betreffenden komplementären Oligonucleotid-Primern hybridisiert. Dann wird eine Reaktion zur Verlängerung der Primer in 5' 3'-Richtung mittels einer Polymerase vorgenommen. Anschließend wird der resultierende Doppelstrang dissoziiert. Dieser Zyklus kann so oft wiederholt werden, wie es geeignet erscheint.

Die Änderung der Fluoreszenzintensität in der PCR-Lösung wird entweder nach oder während der PCR gemessen. Da das interkalierende Fluorochrom infolge seines Einbaus in die doppelsträngige DNA eine Änderung seiner Fluoreszenzcharakteristik eingeht, gibt die Änderung der Fluoreszenzintensität zwischen Beginn und Ende der PCR oder die Änderung während der PCR einen Hinweis darauf, ob die separierte DNA oder RNA die spezifizierte Sequenz besitzt.

Wenn das vorstehend beschriebene Nachweisverfahren angewandt wird, besteht keine Notwendigkeit, zusätzliche Mengen des Reagenz hinzuzufügen, nachdem die PCR einmal begonnen hat. Deshalb wird in der Praxis die PCR-Lösung zuerst in ein Gefäß gegeben, dann werden die extrahierten Nucleinsäuren oder die Nucleinsäuren, die man aus diesen Nucleinsäuren mittels der reversen Transkriptionsreaktion erhält, zugegeben. Danach wird das Gefäß verschlossen, und die Schritte der PCR und die Messung der Fluoreszenzintensität werden in einem hermetisch abgeschlossenen Zustand durchgeführt. Dadurch läßt sich die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung eines Aerosols weiter vermindern.

Dem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung gemäß stellt die Erfindung ferner eine Reagenzienpackung zur Durchführung des auf den vorangegangenen Seiten beschriebenen Nucleinsäure-Extraktionsverfahrens bereit. Diese Reagenzienpackung enthält Träger und Reagenz C, die ebenfalls vorstehend beschrieben wurden. Träger und Reagenz C werden bis zur Verwendung getrennt voneinander gehalten. Dies kann man z. B. dadurch erreichen, daß der Träger und das Reagenz C in getrennten Behältern gehalten werden, wobei der Träger im festen Zustand und das Reagenz C im flüssigen Zustand vorliegen.

Die Reagenzienpackung kann wahlweise ein Reaktionsgefäß enthalten, das aus einem geeigneten Plastikmaterial hergestellt ist und das einen Reaktionsraum zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Extraktion von Nucleinsäuren (erster Aspekt der Erfindung) oder des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis einer spezifizierten Nucleinsäuresequenz (zweiter Aspekt der Erfindung) bereitstellen kann. Wenn es einen Bedarf gibt, nicht nur Nucleinsäuren zu extrahieren, sondern außerdem eine bestimmte Nucleinsäuresequenz nachzuweisen, enthält die Reagenzienpackung bevorzugt ein hermetisch verschließbares Reaktionsgefäß.

Der Vorteil der Reagenzienpackung besteht darin, daß man, wenn der Träger in einer geeigneten Form, z. B. als gefriergetrocknetes Pulver, im Reaktionsgefäß vorgelegt wurde, nur noch die zu untersuchende Probe und dann das Reagenz C zum Röhrchen zugeben muß, um das Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren und, falls gewünscht, zum Nachweis einer spezifizierten Nucleinsäuresequenz zu beginnen.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung weiter erläutern.

Beispiel 1

Extraktion aus gezüchteten Zellen

Hybridomzellen von Maus-Myelomzellen und Lymphozytenzellen von Mäusen, die mit CEA (cancer embryonic antigen, embryonales Krebsantigen) sensibilisiert worden waren, wurden in einem DMEM-Medium gezüchtet. Beim Erreichen einer Dichte von 4×10^5 pro ml Kulturlösung wurden 100 µl der Lösung in ein 0,5 ml großes Probenröhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde 1 Minute bei 7000 UpM zentrifugiert, und der Überstand wurde entfernt. Das Präzipitat wurde in 20 µl DMED-Medium aufgenommen. Zur Suspension wurde 1 µl (10 µg) Dextran (Mol. Gew. 5×10^5) gegeben und gemischt. Danach wurden 100 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% iso-Propylalkohol) gegeben, und das Gemisch wurde ungefähr 20 Sekunden gerührt. Nachfolgend wurde 2 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, wodurch die Nucleinsäuren sedimentiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren im Präzipitat verblieben. Zum Präzipitat wurden 100 µl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, gegeben. Es wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Dann wurde das Gemisch 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Präzipitat wurde nach dem fluorometrischen Verfahren von Kissane und Robins (J. Biol. Chem., 233 (1958), 184) zur Bestimmung der DNA-Menge untersucht. Das Präzipitat wurde außerdem einer Veraschungsbehandlung unterzogen, und eine Phosphorbestimmung (Anal. Chem. 28 (1956), 1756) wurde zur Messung der Gesamtnucleinsäuremenge (DNA + RNA) im Präzipitat vorgenommen. Die RNA-Menge wurde durch Subtrahieren der DNA-Menge von der Gesamtmenge von Nucleinsäuren (DNA + RNA) berechnet.

Zu Vergleichszwecken wurden Nucleinsäuren von derselben Probe sowohl nach dem Proteinase K-/Phenol- als auch nach dem AGPC-Verfahren extrahiert.

Das Proteinase K-/Phenol-Verfahren wurde nach der Prozedur von Keller, G.H. et al. (Anal. Biochem., 170 (1988), 441—450) durchgeführt. Zuerst wurden 40 µl eines Reagenz (150 mM Natriumchlorid, 10 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8), 2% SDS und 250 µg/ml Proteinase K) in einem Proberöhrchen mit einem Fassungsvermögen von 0,5 ml zu 20 M^l einer Zellsuspension gegeben. Das Gemisch wurde dann ca. 20 Sekunden gerührt. Anschließend wurde 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 60 µl einer Lösung (Phenol/Chloroform/iso-Amylalkohol = 25 : 24 : 1) hinzugegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert. Ein Teil (40 µl) des Überstandes (wäßrige Phase) wurden

entnommen und mit 8 µl 4 M Kaliumacetat versetzt. Danach wurden 10 µg (1 µl) Glycogen und 50 µl iso-Propylalkohol zugegeben, und das Gemisch wurde gerührt. Danach wurde es 30 Minuten bei -20°C gehalten. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl 75%iger Ethanol wurden zum Präzipitat gegeben, und das Gemisch wurde gerührt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand verworfen, wobei die Nucleinsäuren im Präzipitat verblieben.

Das AGPC-Verfahren wurde gemäß der Prozedur von Chomczynski, P. et al. (Anal. Biochem. 162 (1987), 156—159) durchgeführt. Zuerst wurden 40 µl eines Reagenz (6 M Guanidiniumthiocyanat, 37,5 mM Natriumcitrat, 0,75% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 0,15 M 2-Mercaptoethanol) in einem Teströhrchen mit einem Fassungsvermögen von 0,5 ml zu 20 µl einer Zellsuspension gegeben. Das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Danach wurden 6 µl 2 M Natriumacetat (pH 4) zugegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Anschließend wurden 60 µl wassergesättigtes Phenol zugegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Im nächsten Schritt wurden 12 µl einer Lösung (Chloroform/iso-Amylalkohol = 49 : 1) zugegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Dann wurde das flüssige Gemisch 15 Minuten in Eiswasser gekühlt und bei 4°C 20 Minuten mit 15 000 UpM zentrifugiert. Ein Teil (60 µl) des Überstandes (wäßrige Phase) wurde entnommen und mit 60 µl iso-Propylalkohol vermischt. Das Gemisch wurde gerührt und 1 Stunde bei -20°C gekühlt. Danach wurde der Überstand verworfen und zum Präzipitat wurden 100 µl 75%iger Ethanol gegeben und anschließend wurde gerührt. Im letzten Schritt wurde das Gemisch 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren im Präzipitat verblieben. Die in den beiden herkömmlichen Verfahren erhaltenen Präzipitate wurden nach der vorstehend bereits beschriebenen Prozedur analysiert. Die Analyseergebnisse sind nachstehend in Tabelle I gezeigt. Aus Tabelle I geht hervor, daß das erfindungsgemäße Verfahren den beiden herkömmlichen Verfahren bezüglich der Extraktionseffizienz überlegen ist.

Tabelle I

Verfahren	DNA (µg)	RNA (µg)	DNA + RNA (µg)
Erfindung	2,9	1,4	4,3
Proteinase K-/ Phenol-Verfahren	1,6	0,7	2,3
AGPC-Verfahren	0,2	1,0	1,2

Beispiel 2

Extraktion aus E. coli

E. coli (JM 109) wurde in L-Nährmedium gezüchtet. Beim Erreichen einer Dichte von E. coli-Zellen von 2×10^8 pro ml Kulturlösung wurde 1 ml der Lösung in ein 1,5 ml Probenröhrchen gegeben und 1 Minuten bei 7000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Präzipitat wurde in 50 µl L-Nährmedium suspendiert. Zur Suspension wurden 2 µl (20 µg) Dextran (Mol. Gew. 5×10^5) gegeben und damit vermischt. Danach wurden 250 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% iso-Propylalkohol) gegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Danach wurde 2 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, um die Nucleinsäuren zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und 250 µl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zum Präzipitat gegeben. Das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt und dann 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren im Präzipitat verblieben. Die DNA-Menge und die Gesamtmenge von Nucleinsäuren (DNA + RNA) wurden analog zu Beispiel 1 gemessen, und die RNA-Menge wurde berechnet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle II gezeigt.

Tabelle II

DNA (µg)	RNA (µg)	DNA + RNA (µg)
4,4	36,6	41,0

Beispiel 3

Extraktion von Hepatitis B-Virus-DNA

1 µl (10 µg) Dextran mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 und 20 µl Serum von Patienten mit Hepatitis B

wurden zusammen in Probenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von je 0,5 ml gegeben. Danach wurden 100 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol) zugegeben, und das Gemisch wurde ungefähr 20 Sekunden gerührt. Durch 2minütige Zentrifugation bei 15 000 UpM wurden die Nucleinsäuren in das Sediment gebracht. Der Überstand wurde verworfen und zum Präzipitat wurden 100 µl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, gegeben. Danach wurde ca. 20 Sekunden gerührt und dann 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren im Präzipitat verblieben. 5

Zum Präzipitat wurden 25 µl eines PCR-Reagenz (Takara Shuzo Co., Ltd.) gegeben und eine PCR wurde über 40 Cyclen unter Verwendung eines DNA-Thermal-Cyclers (PCR-Maschine, Perkin-Elmer-Cetus) durchgeführt. Die nachstehend beschriebenen Primer wurden zur spezifischen Amplifikation von Hepatitis B-Virus (HBV) spezifischen Nucleinsäuren verwendet und die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 10

Schritte eines Zyklus

Denaturieren	94 °C	1 min	15
Zusammenlagern	55 °C	45 sec	
Synthese	72 °C	1 min	20

Basensequenzen der Primer

5'-GGACTTCTCTCAATTTCTAGGG-3' 25
5'-CAAATGGCACTAGTAAACTGAGC-3'

Nach der PCR wurden die amplifizierten Nucleinsäuren einer Elektrophorese unterworfen und die optischen Dichten der betreffenden Banden wurden durch Anfärben mit Ethidiumbromid miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt. 30

Beispiel 4

Extraktion von RNA des Hepatitis C-Virus

1 µl Dextran (10 µg) mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 wurde zusammen mit 20 µl Serum von Patienten mit Hepatitis C in Probenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von je 0,5 ml gegeben. Danach wurden 100 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol) gegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Durch 2minütige Zentrifugation bei 15 000 UpM wurden die Nucleinsäuren sedimentiert. Der überstand wurde gefällt, und 100 µl 40%-iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurden zum Präzipitat gegeben. Danach wurde ca. 20 Sekunden gerührt und dann 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren im Präzipitat verblieben. 35 40

Das Präzipitat wurde mit 10 µl eines Reagenz für die reverse Transkription (Takara Shuzo Co., Ltd.) versetzt und darin gelöst. Danach wurde eine reverse Transkriptionsreaktion mit einem DNA-Thermal-Cycler (Perkin-Elmer-Cetus) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sind nachfolgend angegeben. 45

Aneinanderlagern	25 °C	10 min	
Synthese	42 °C	30 min	
Inaktivieren der reversen Transkriptase	99 °C	5 min	50
Aufbewahrung	25 °C		

Anschließend wurden zu 5 µl der Lösung der reversen Transkriptionsreaktion 20 µl eines PCR-Reagenz gegeben, und die PCR wurde über 40 Zyklen unter Verwendung eines DNA-Thermal-Cyclers (Perkin-Elmer-Cetus) durchgeführt. Die nachstehend beschriebenen Primer wurden zur spezifischen Amplifikation von Nucleinsäuren des Hepatitis C-Virus (HCV) verwendet. Die Bedingungen für die PCR sind nachfolgend angegeben: 55 60

Schritte des Zyklus

5	Denaturieren	95 °C	30 sec
	Aneinanderlagern	65 °C	30 sec
	Synthese	72 °C	1 min

10 Basensequenzen der Primer
 5'-CTCCACCATAGATCACTCCCC-3'
 5'-GCACTCGCAAGCACCCCTAT-3'

15 Nach der PCR wurden die amplifizierten Nucleinsäuren einer Elektrophorese unterworfen und die optischen Dichten der betreffenden Banden wurden durch Anfärben mit Ethidiumbromid miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt.

Beispiel 5

20 Extraktion von RNA des Hepatitis C-Virus

2 µl (20 µg) Dextran mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 wurden zusammen mit 100 µl Serum von Patienten mit Hepatitis C in Probenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml gegeben. Danach wurden 500 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol) zugegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Durch 3minütige Zentrifugation bei 15 000 UpM wurden die Nucleinsäuren sedimentiert. Die Überstände wurden verworfen und 200 µl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zum Sediment gegeben. Anschließend wurde ca. 20 Sekunden gerührt und 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren im Präzipitat verblieben.

Das Präzipitat wurde mit 20 µl eines Reagenz für die reverse Transkription vermischt und darin gelöst. Danach wurde eine reverse Transkriptionsreaktion analog zu Beispiel 4 durchgeführt. Anschließend wurden 40 µl eines PCR-Reagenz mit 10 µl der Reaktionslösung der reversen Transkription vermischt, und die PCR wurde analog zu den in Beispiel 4 genannten Bedingungen durchgeführt.

35 Zum Vergleich wurde Nucleinsäure nach dem Natriumjodid-Verfahren (Ishizawa, M. et al. in Nucleic Acid Res. 19 (20) (1991), 5792) extrahiert. Zuerst wurden 100 µl Serum von Patienten mit Hepatitis C in Teströhrchen mit einem Fassungsvermögen von je 1,5 ml gegeben. Dann wurden 300 µl eines Reagenz, das 6 M NaJ, 13 mM EDTA, 0,5% Natrium-N-Lauroylsarcosin, 10 µg Glycogen und Tris-HCl (pH 8) enthielt, zugegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt. Anschließend wurde 15 Minuten bei 60°C inkubiert. Danach wurden 400 µl iso-Propylalkohol zugegeben, und das Gemisch wurde ungefähr 20 Sekunden gerührt und anschließend 15 Minuten stehengelassen. Dann wurde die Lösung 5 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde 1 ml 40%iger iso-Propylalkohol zugegeben, und das Gemisch wurde ca. 20 Sekunden gerührt und anschließend 5 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Nucleinsäuren befanden sich im Präzipitat. Das Präzipitat wurde einer reversen Transkriptionsreaktion und einer PCR unter denselben Bedingungen, wie sie im vorstehenden Absatz beschrieben wurden, unterworfen. Nach Beendigung der PCR wurden 4 µl der Reaktionslösung durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit einem von Tosoh Corp. hergestellten Apparat untersucht. Die Säule enthielt das TSK-Gel G4000SW zur Gel-Permeations-Chromatographie und der Nachweis durch UV-Absorption wurde bei 260 nm mit einem UV 8000 (Tosoh Corp.), durchgeführt. Das Elutionsmittel war Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,8) und die Flußrate betrug 1 ml/Minute. Die Analyseergebnisse sind in Tabelle III aufgeführt. Das erfindungsgemäße PCR-Amplifikationsprodukt wurde in einer Menge von durchschnittlich 26 ng pro 10 µl PCR-Lösung nachgewiesen. Wenn nach dem Natriumjodid-Verfahren gearbeitet wurde, konnten demgegenüber nur 3 ng des Amplifikationsproduktes nachgewiesen werden.

Tabelle III

PCR-Amplifikationsprodukt (ng)	Durchschnitt
Erfindung	26
Natriumjodid-Verfahren	3

Beispiel 6

Extraktion von DNA des Hepatitis B-Virus

1 µl (10 µg) Dextran mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 wurde zusammen mit 20 µl Serum von Patienten mit Hepatitis B parallel in einer Reihe von Probenröhrchen, von denen jedes ein Fassungsvermögen von 0,5 ml aufwies, gegeben. Zu den Proben wurden verschiedene Zusammensetzungen von Reagenz C (siehe unten) gegeben und damit vermischt:

- (1) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol;
- (2) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Kaliumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol; und
- (3) 100 µl Reagenz C, enthaltend 3,2 M Guanidiniumhydrochlorid, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol.

Nach Zugabe dieser unterschiedlichen Zusammensetzungen von Reagenz C und dem Vermischen wurde 2 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, so daß die Nucleinsäuren in das Präzipitat gelangten. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl 40% iso-Propanol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zugegeben. Dann wurde 20 Sekunden gerührt, das Gemisch 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Nucleinsäuren befanden sich weiter im Präzipitat. Die so extrahierten Nucleinsäuren wurden analog zu Beispiel 3 einer PCR unterworfen. Nach Reaktionsende wurde eine Elektrophorese durchgeführt und die optischen Dichten der betreffenden produzierten Banden miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 gezeigt. Die Lösungen, die die Zusammensetzungen (1) bis (3) des Reagenz C enthielten, produzierten offensichtlich Banden mit vergleichbaren Intensitäten.

Beispiel 7

Extraktion von DNA des Hepatitis B-Virus

Je 1 µl (10 µg) Dextran mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 wurden gemeinsam mit 20 µl Serum von Patienten mit Hepatitis B in eine Reihe von Probenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von je 0,5 ml gegeben. Verschiedene Zusammensetzungen von Reagenz C (siehe unten) wurden zu den Proben gegeben und damit vermischt:

- (1) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% n-Propylalkohol;
- (2) 100 µl Reagenz c, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% iso-Propylalkohol;
- (3) 80 µl Reagenz C, enthaltend 3 M Guanidiniumthiocyanat, 19 mM Natriumcitrat, 75 mM 2-Mercaptoethanol, 0,38% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 50% n-Butylalkohol;
- (4) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% n-Butylalkohol;
- (5) 80 µl Reagenz C, enthaltend 3 M Guanidiniumthiocyanat, 19 mM Natriumcitrat, 75 mM 2-Mercaptoethanol, 0,38% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 50% sek.-Butylalkohol; und
- (6) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% sek.-Butylalkohol.

Nach Zugabe dieser verschiedenen Zusammensetzungen von Reagenz C und nach dem Vermischen wurde 2 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, wodurch die Nucleinsäuren in das Präzipitat gebracht wurden. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl 40%iger iso-Propanol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde

zugegeben. Es wurde dann ca. 20 Sekunden gerührt. Danach wurde das Gemisch 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren weiter im Präzipitat verblieben. Die so extrahierten Nucleinsäuren wurden analog zu Beispiel 3, einer PCR unterworfen. Nach Reaktionsende wurde eine Elektrophorese durchgeführt und die optischen Dichten der betreffenden Banden verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 gezeigt. Es ist offensichtlich, daß die die Zusammensetzungen (1) bis (6) von Reagenz C

Beispiel 8

Extraktion von Virus DNA von Hepatitis B-Virus

1 µl (10 µg) Dextran mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 wurde zusammen mit 20 µl Serum von Patienten mit Hepatitis B in eine Reihe von Probenröhrchen mit jeweils 0,5 ml Fassungsvermögen gegeben. Verschiedene Zusammensetzungen von Reagenz C (siehe unten) wurden zu den Proben gegeben und damit vermischt:

- (1) 80 µl von Reagenz C, enthaltend 3 M Guanidiniumthiocyanat, 19 mM Natriumcitrat, 75 mM 2-Mercaptoethanol, 0,38 Natrium-N-Lauroylsarcosin und 50% tert-Amylalkohol;
- (2) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% tert-Amylalkohol;
- (3) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% tert-Butylalkohol; und
- (4) 100 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,3% Natrium-N-Lauroylsarcosin und 60% iso-Propylalkohol.

Nach Zugabe dieser Zusammensetzungen von Reagenz C und nach dem Vermischen wurde 2 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, so daß die Nucleinsäuren in das Präzipitat überführt wurden. Der Überstand wurde verworfen und 100 µl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, zugegeben. Dann wurde 20 Sekunden gerührt. Danach wurde das Gemisch 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren weiter im Präzipitat verblieben. Die so extrahierten Nucleinsäuren wurden analog zu Beispiel 3 einer PCR unterworfen. Nach Reaktionsende wurde eine Elektrophorese durchgeführt und die optischen Dichten der betreffenden Banden miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 gezeigt. Es ist offensichtlich, daß die die verschiedenen Zusammensetzungen von Reagenz c enthaltenden Lösungen zu Banden mit vergleichbaren Intensitäten führten.

Beispiel 9

Extraktion von RNA des Hepatitis C-Virus

Teströhrchen mit einem jeweiligen Fassungsvermögen von 1,5 ml wurden mit 0, 0,5, 1, 2 und 5 µl (0, 5, 10, 20 und 50 µg) einer Acrylamidlösung (Molekulargewicht ungefähr $0,7 \times 10^5$) bzw. 2 µl (20 µg) Dextran mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 beladen. Weiterhin wurden je 100 µl Serum von Patienten mit Hepatitis C in die Röhrchen gegeben und die Gemische ca. 5 Sekunden gerührt. Dann wurden 500 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol) zugegeben. Nach 20 Sekunden Rühren wurde 3 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, wodurch die Nucleinsäuren in das Präzipitat überführt wurden. Der Überstand wurde verworfen, und 200 µl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zum Präzipitat gegeben. Nach 20 Sekunden Rühren wurde 3 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren weiter im Präzipitat verblieben.

Das Präzipitat wurde mit 20 µl eines Reagenz für die reverse Transkription versetzt und darin gelöst. Die Lösung wurde einer reversen Transkriptionsreaktion analog zu Beispiel 4 unterworfen. Danach wurden 40 µl eines PCR-Reagenz mit 10 µl Reaktionslösung (der reversen Transkription) vermischt und analog zu Beispiel 4 wurde eine PCR durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurden 10 µl der Reaktionslösung durch Hochauflösungs-Flüssigkeits-Chromatographie mit einem Apparat von Tosoh Corp. analog zu Beispiel 5 untersucht. Die Analyseergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle IV beschrieben.

Tabelle IV

Acrylamidmenge (μg)	PCR-Amplifikations- produkt (ng)	
0	0	5
5	26	10
10	33,5	
20	35	
50	35	15
Dextranmenge (μg)		
20	44	20

In Abwesenheit von mit einer Nucleinsäure copräzipitierendem Acrylamid, wurde keine Hepatitis C-Virus-RNA extrahiert, weshalb kein PCR-Amplifikationsprodukt nachweisbar war. Bei einer Zugabe von Acrylamid in Mengen von 20 μg oder mehr wurde das PCR-Amplifikationsprodukt in einer Menge von ca. 35 ng nachgewiesen. Bei Zugabe von 20 μg Dextran wurde das PCR-Amplifikationsprodukt in einer Menge von ca. 44 ng nachgewiesen.

Beispiel 10

Extraktion von DNA des Hepatitis B-Virus

Nucleinsäuren wurden analog zu Beispiel 4 extrahiert und einer PCR unterworfen, wobei aber Dextran (mit einem Molekulargewicht von 5×10^5) in variierenden Mengen von 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 und 6,4 μl (0, 2, 4, 8, 16, 32 und 64 μg) zugegeben wurde. Nach Ende der PCR wurde eine Elektrophorese durchgeführt und die optischen Dichten der Banden wurden durch Anfärben mit Ethidiumbromid miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 gezeigt. Es ist offensichtlich, daß beim Fehlen von mit Nucleinsäuren copräzipitierendem Dextran keine Hepatitis B-Virus-DNA extrahiert und deshalb keine Bande nachgewiesen wurde. Wenn Dextran in Mengen von 16 μg oder mehr zugegeben wurde, waren die Intensitäten der Banden nahezu miteinander vergleichbar.

Beispiel 11

Extraktion von DNA des Hepatitis B-Virus

Analog zu Beispiel 3 wurden Nucleinsäuren extrahiert und einer PCR unterworfen. Dabei wurde aber Dextran durch Carboxymethylcellulose (Produkt von SIGMA, niedrige Viskosität) ersetzt. Diese wurde in einer Menge von 1 μl (10 μg) verwendet. Nach Beendigung der PCR wurde eine Elektrophorese durchgeführt, und die optischen Dichten der Banden wurden durch Anfärben mit Ethidiumbromid miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Fig. 7 gezeigt. Es ist offensichtlich, daß die Bandenintensitäten miteinander nahezu vergleichbar waren, wenn Dextran bzw. Carboxymethylcellulose als Träger verwendet wurden (als Referenz ist das Ergebnis der Extraktion bei Verwendung von Dextran in Fig. 7 ebenfalls gezeigt).

Beispiel 12

Anwendung auf das PCR-Produkt

Teströhrchen mit einem Fassungsvermögen von je 1,5 ml wurden mit 2 μl (2 μg) einer Lösung von Dextran (Molekulargewicht 5×10^5) beladen. Dazu wurden 20 μl HBV-PCR-Reaktionslösung und 80 μl Wasser gegeben und miteinander vermischt. Anschließend wurden 500 μl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 60 mM β -Mercaptoethanol und 60% iso-Propylalkohol) zugefügt. Nach 20 Sekunden Rühren wurde 3 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, wodurch die Nucleinsäuren in das Präzipitat überführt wurden. Der Überstand wurde verworfen und 100 μl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zum Präzipitat gegeben. Nach 20 Sekunden Rühren wurde 3 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren weiter im Präzipitat verblieben. Zum Auflösen wurden dann 20 μl Wasser zum Präzipitat gegeben.

Die PCR-Lösung (10 μl) wurde sowohl vor als auch nach der Extraktion von Nucleinsäuren durch Hochauflö-

sungs-Flüssigkeits-Chromatographie analog zu Beispiel 5 mit einem Apparat von Tosoh Corp. analysiert. Die Säule enthielt das TSK-Gel G3000SW für die Gel-Permeations-Chromatographie.

Die Ergebnisse sind in Fig. 8 gezeigt, aus der sich ersehen läßt, daß sowohl das PCR-Amplifikationsprodukt als auch das Primer-Oligomer in Ausbeuten von beinahe 100% wiedergewonnen werden. Es wird außerdem
5 deutlich, daß sowohl der Primer als auch die Desoxyribonucleosid-Triphosphate entfernt worden waren.

Beispiel 13

PCR unter Verwendung extrahierter Nucleinsäuren

10 2 µl (20 µg) Dextran mit einem Molekulargewicht von 5×10^5 wurden zusammen mit 100 µl Serum von Patienten mit Hepatitis B in Probenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml gegeben. Dann wurden 500 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol) zugegeben. Das Gemisch wurde 20 Sekunden gerührt und dann 3 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, wodurch die
15 Nucleinsäuren in das Präzipitat überführt wurden. Der Überstand wurde verworfen und 20 µl 40%iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zugegeben. Danach wurde 20 Sekunden gerührt und dann 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren weiter im Präzipitat verblieben. Zum Präzipitat wurden 50 µl eines PCR-Reagenz gegeben, und die PCR wurde analog zu Beispiel 3 durchgeführt.

20 Zu Vergleichszwecken wurden Nucleinsäuren nach dem Natriumjodid-Verfahren (Ishizawa, M. et al., in Nucleic Acid Res. 19(20) (1991), 5792) analog zu Beispiel 5 extrahiert, und eine PCR wurde in der gleichen Weise, wie sie gerade vorstehend beschrieben wurde, durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurden 10 µl Reaktionslösung durch Hochauflösungs-Flüssigkeits-Chromatographie unter Verwendung eines Apparates von Tosoh Corp. analog zu Beispiel 5 analysiert.

25 Die Analyseergebnisse sind in Tabelle V gezeigt. Das erfindungsgemäß erhaltene PCR-Amplifikationsprodukt wurde in einer Menge von durchschnittlich 7,5 ng pro 10 µl PCR-Lösung nachgewiesen, wohingegen nur 4,3 ng des nach dem Natriumjodidverfahren erhaltenen Amplifikationsproduktes nachgewiesen werden konnten. Die in Tabelle V gezeigten Ergebnisse zeigen den Mittelwert von 4 Proben.

30 Tabelle V

PCR-Amplifikationsprodukt (ng)

35	Erfindung	7,5
	Natriumjodid-Verfahren	4,3

Beispiel 14

40 Teströhrchen mit einem jeweiligen Fassungsvermögen von 1,5 ml wurden jeweils mit einem der nachfolgenden Träger beladen:

- 45 (1) 2 µl (20 µg) Dextran (Molekulargewicht 5×10^5);
 (2) 1 µl (10 µg) Dextran (Molekulargewicht 5×10^5) und 1 µl (10 µg) Acrylamid (Molekulargewicht 7×10^5);
 (3) 1 µl (10 µg) Acrylamid (Molekulargewicht 7×10^5) und 1 µl (10 µg) Carboxymethylcellulose (Produkt von SIGMA; niedrige Viskosität).

50 Weiterhin wurden in die Röhrchen 100 µl Serum von Patienten mit Hepatitis B gegeben. Dann wurden 500 µl Reagenz C (2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol) gegeben, und die Gemische wurden ca. 20 Sekunden gerührt. Durch 3 Minuten Zentrifugation bei 15 000 UpM wurden die Nucleinsäuren in das Präzipitat überführt. Der Überstand wurde verworfen und 200 µl 40%-iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zum Präzipitat gegeben. Anschließend wurde 20 Sekunden gerührt und 1 Minute bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren weiter im Präzipitat verblieben.

55 Zum Präzipitat wurden 50 µl PCR-Reagenz gegeben, und eine PCR wurde analog zu Beispiel 3 durchgeführt. Nach Vervollständigung der PCR, wurde analog zu Beispiel 5 die PCR-Lösung durch Hochauflösungs-Flüssigkeits-Chromatographie mit einem Apparat von Tosoh Corp. analysiert. Die Analyseergebnisse sind nachstehend in Tabelle VI gezeigt. Es ist offensichtlich, daß ein einzelner Träger und ein Gemisch von zwei Trägern zu Banden mit vergleichbaren Intensitäten führten. Die Ergebnisse der Tabelle VI geben einen Mittelwert von 4 Proben wieder.

60 Tabelle VI

	Träger	PCR-Amplifikationsprodukt (ng)
65	Dextran	37
	Dextran und Acrylamid	33
	Acrylamid und Carboxymethylcellulose	37

Beispiel 15

Probenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von jeweils 0,5 ml wurden mit je 2 µl (20 µg) einer Lösung von Dextran (Molekulargewicht 5×10^5) beladen. In die Röhrchen wurden außerdem 100 µl Serum von Patienten mit Hepatitis B gegeben. Verschiedene Zusammensetzungen von Reagenz C (siehe unten) wurden zu den Proben gegeben und damit vermischt:

- (1) 500 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat und 60% iso-Propylalkohol;
- (2) 500 µl Reagenz C, enthaltend 2,4 M Guanidiniumthiocyanat, 15 mM Natriumcitrat, 30% iso-Propylalkohol und 30% tert.-Butylalkohol.

Nach Zugabe dieser Zusammensetzungen von Reagenz C und nach dem Vermischen wurde 3 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert, um die Nucleinsäuren in das Präzipitat zu überführen. Der Überstand wurde verworfen, und 200 µl 40%-iger iso-Propylalkohol, der 200 mM Kaliumchlorid enthielt, wurde zugegeben. Anschließend wurde 20 Sekunden gerührt und dann 1 Minuten bei 15 000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei die Nucleinsäuren weiter im Präzipitat verblieben.

Zum Präzipitat wurden 50 µl PCR-Reagenz gegeben, und die PCR wurde analog zu Beispiel 3 durchgeführt. Nach Beendigung der PCR, wurde die PCR-Lösung analog zu Beispiel 5 durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie mit einem Apparat von Tosoh Corp. analysiert. Die Analyseergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle VII gezeigt. Wenn das Reagenz C nur iso-Propylalkohol enthielt, wurde das PCR-Amplifikationsprodukt in einer Menge von durchschnittlich 42 ng pro 10 µl PCR-Reaktionslösung nachgewiesen. Wenn das Reagenz C iso-Propylalkohol und tert.-Butylalkohol enthielt, wurde das PCR-Amplifikationsprodukt in einer Menge von durchschnittlich 33 ng pro 10 µl PCR-Reaktionslösung nachgewiesen. Die in Tabelle VII gezeigten Ergebnisse geben die Mittelwerte von 2 Proben wieder.

Tabelle VII

In Reagenz C enthaltener Alkohol	PCR-Amplifikationsprodukt (ng)
iso-Propylalkohol	42
iso-Propylalkohol und tert.-Butylalkohol	33

Die vorliegende Erfindung bietet eine Reihe von Vorteilen, die nachfolgend deutlich werden. Mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A, und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol und tert.-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B, werden vorbereitend vermischt, um das Reagenz C herzustellen. Dies macht es möglich, die Menge zu verringern, in denen diese Reagenzien verwendet werden müssen. Als Beispiel sei ein Fall betrachtet, bei dem eine 10 µl-Probe so beschaffen ist, daß sie ein proteindenaturierendes Agens und iso-Propanol in den Endkonzentrationen 2 M bzw. 50% enthält. Im Guanidiniumverfahren ist typischerweise die Zugabe einer 6 M Guanidiniumlösung in einer Menge von 20 µl nötig, und dann wird ungefähr 100%-iger iso-Propylalkohol in einer Menge von 30 µl zugegeben. Im Gegensatz dazu verlangt das erfindungsgemäße Verfahren die Zugabe von lediglich 20 µl eines Nucleinsäure extrahierenden Reagenz, das sich aus ca. 75%-igem iso-Propylalkohol zusammensetzt, der 3 M Guanidiniumthiocyanat enthält. Beim Guanidiniumverfahren ergeben sich am Ende 60 µl einer Lösung, die die Probe, 2 M Guanidiniumthiocyanat und ca. 50% iso-Propanol enthält, wohingegen sich erfindungsgemäß nur 30 µl einer Lösung ergeben, die dieselben Konzentrationen aufweisen. Somit läßt sich der flüssige Abfall, der nach dem Extraktionsverfahren entsorgt werden muß, dementsprechend vermindern. Außerdem müssen beim erfindungsgemäßen Verfahren keine giftigen oder gefährlichen Substanzen, wie Chloroform oder Phenol verwendet werden und es kann daher verglichen mit den herkömmlichen Verfahren verhältnismäßig leicht durchgeführt werden.

Erfindungsgemäß werden die extrahierten Nucleinsäuren im Präzipitat erhalten, und die vorliegende Erfindung kann mit außerordentlich einfachen Verfahrensschritten durchgeführt werden, wenn man einen Vergleich mit Verfahren aus dem Stand der Technik vornimmt, bei denen es auf die Löslichkeit der Nucleinsäure in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten ankommt, und bei denen die flüssige Phase, in der die interessierende Nucleinsäure gelöst ist von der anderen flüssigen Phase abgetrennt werden muß, um die Nucleinsäure zu extrahieren. Beim Nacharbeiten der vorliegenden Erfindung werden somit keine großen Anforderungen an die Geschicklichkeit gestellt, die gewünschten Nucleinsäuren können jedoch mit gleichbleibend hoher Effizienz extrahiert werden.

Vorteilhaft ist ferner, daß das Reagenz A erfindungsgemäß im Reagenz C, das zur Probe gegeben wird, in einer niedrigeren Konzentration enthalten sein kann, und damit sein Auskristallisieren wirksam verhindert wird. Außerdem läßt sich die Konzentration von Reagenz B ebenfalls genügend weit vermindern, um seine Verdampfung zu verhindern. Dadurch eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren besonders für eine automatisierte Verwendung. Wenn die Reagenzien A und B einzeln verwendet werden, ist es im allgemeinen schwierig, die Genauigkeit ihrer Zugabe in kleinen Mengen zu optimieren. Man kann jedoch erwarten, daß sich das erfindungsgemäße Reagenz zur Extraktion von Nucleinsäuren mit höherer Genauigkeit zugeben läßt.

Erfindungsgemäß werden Träger und Reagenz C, das die Reagenzien A und B enthält, verwendet. Abgesehen

von den vorstehend genannten Vorteilen liefert die Erfindung die Möglichkeit, Nucleinsäuren mit einer höheren Effizienz zu extrahieren als mit den herkömmlichen Verfahren.

Dem zweiten Aspekt der Erfindung gemäß, stellt die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis einer bestimmten Nucleinsäuresequenz bereit, das die Durchführung einer PCR und die Messung der Fluoreszenzintensität in einem geschlossenen Gefäß erlaubt. Somit beinhaltet bei einem Vergleich mit herkömmlichen Verfahren, die lediglich Nucleinsäuren durch die PCR amplifizieren, und die amplifizierten Nucleinsäuren nachweisen, das erfindungsgemäße Nachweisverfahren eine einfache Prozedur und bietet außerdem die Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit einer Aerosolbildung wirksam zu vermindern.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren aus einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß es die nachfolgenden Schritte umfaßt:

(1) Vermischen der Probe mit einem Träger, der mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose ist, um ein flüssiges Gemisch zu erzeugen;

(2) Vermischen des flüssigen Gemisches mit Reagenz C, um die Nucleinsäuren und den Träger auszufällen, wobei das Reagenz C mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol und tert.-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B enthält; und

(3) Separieren von gefällten Nucleinsäuren und gefälltem Träger aus der flüssigen Phase

2. Verfahren zum Nachweis einer spezifizierten Nucleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß es die nachfolgenden Schritte umfaßt:

(1) Vermischen der Probe mit einem Träger, der mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid, Carboxymethylcellulose ist, um ein flüssiges Gemisch zu erzeugen;

(2) Vermischen des flüssigen Gemisches mit Reagenz C, um die Nucleinsäuren und den Träger auszufällen, wobei das Reagenz C mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol und tert.-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B enthält;

(3) Separieren von gefällten Nucleinsäuren und gefälltem Träger aus der flüssigen Phase;

(4) Überführen der separierten Nucleinsäuren in DNA durch eine reverse Transkriptionsreaktion, wenn es sich bei ihnen um RNA handelt;

(5) Unterwerfen der entweder in Schritt (3) separierten oder in Schritt (4) erhaltenen Nucleinsäuren einer Polymerasekettenreaktion in einer PCR-Lösung, die ein Gemisch von Mononucleosid-Triphosphaten, eine Polymerase, ein interkalierendes Fluorochrom und eine Oligonucleotid-Sonde enthält, die zur Amplifikation mindestens einer spezifizierten Sequenz geeignet ist;

(6) Messen der Änderung der Fluoreszenzintensität, die als Ergebnis der PCR auftritt, oder der Änderung der Fluoreszenzintensität der Reaktionslösung während die PCR voranschreitet; und

(7) Bestimmen (auf Grundlage der Änderung der Fluoreszenzintensität), ob eine Nucleinsäure mit der spezifizierten Sequenz in der Probe vorhanden war.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die PCR und die Messung der Änderung der Fluoreszenzintensität in einem geschlossenen Gefäß durchgeführt wird, das die extrahierten Nucleinsäuren und die PCR-Lösung in einem hermetisch abgeschlossenen Zustand enthält.

4. Reagenzienpackung zur Extraktion von Nucleinsäuren, die voneinander getrennt mindestens einen Träger und ein Reagenz C enthält, wobei

(1) der Träger mindestens eine der Substanzen Dextran, Acrylamid oder Carboxymethylcellulose ist; und

(2) das Reagenz C mindestens ein aus den Substanzen Guanidiniumthiocyanat, Guanidiniumhydrochlorid, Kaliumthiocyanat und Natriumthiocyanat ausgewähltes Reagenz A und mindestens ein aus den Substanzen n-Propylalkohol, iso-Propylalkohol, n-Butylalkohol, sek.-Butylalkohol, tert.-Butylalkohol und tert.-Amylalkohol ausgewähltes Reagenz B enthält.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

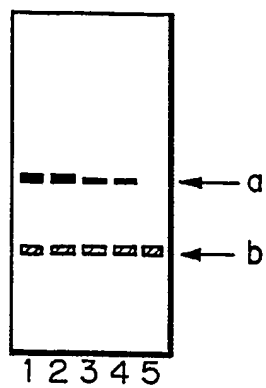


Fig.2

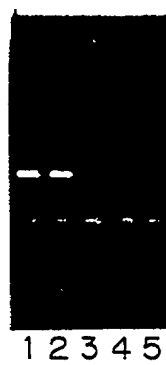
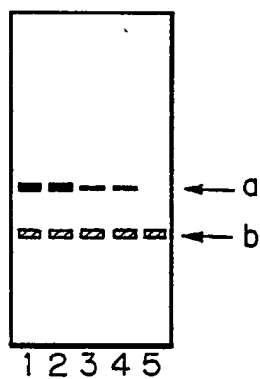


Fig. 3

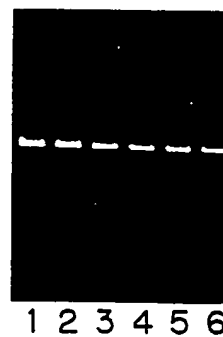
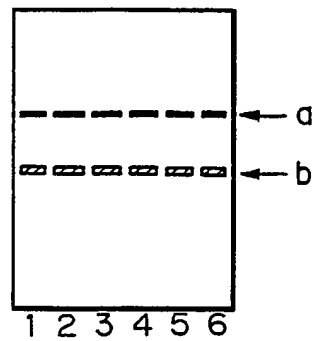


Fig. 4

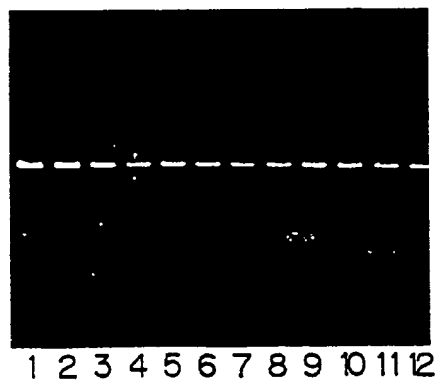
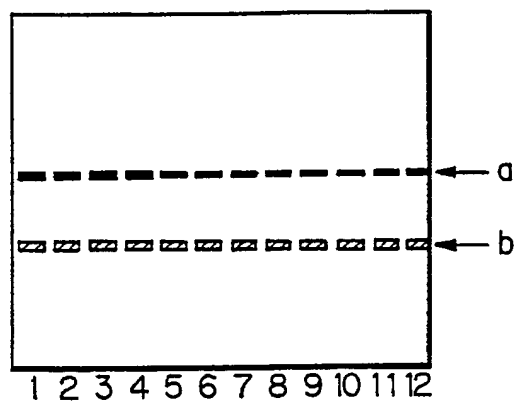


Fig. 5

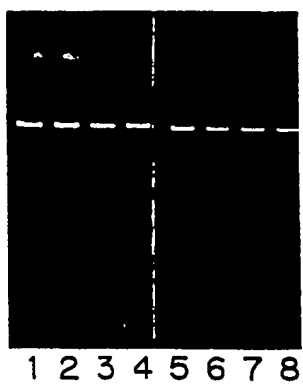
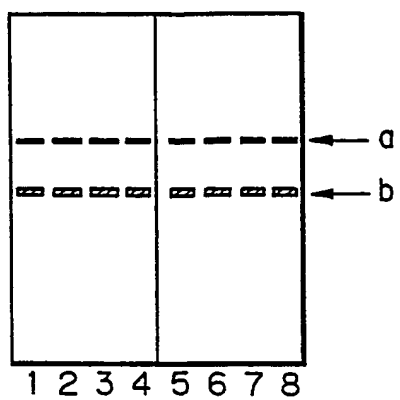


Fig. 6

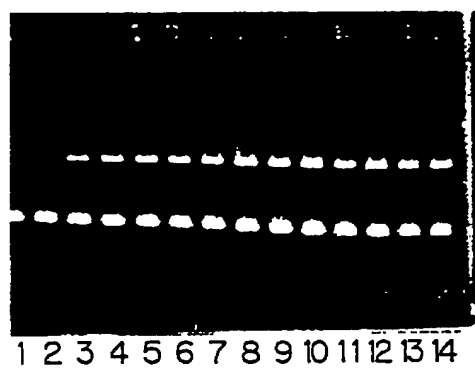
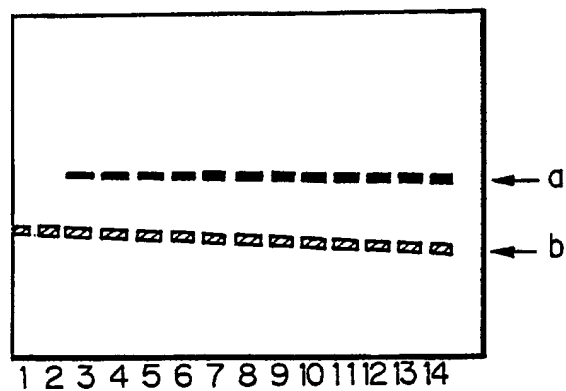


Fig. 7

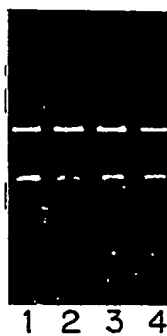
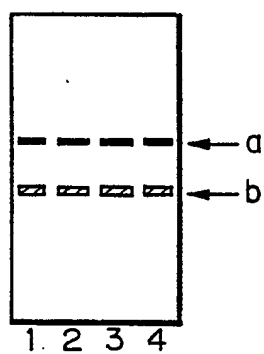


Fig. 8

